Original Article / Özgün Makale

MEDICINE PALLIATIVE CARE

Article ID: 735348

J Med Palliat Care 2020; 1(2): 23-27

Ewing sarkoma hücre hatlarında miR-214-3p'nin fonksiyonel rolünün değerlendirilmesi

Evaluation of functional role of miR-214-3p in Ewing sarcoma cell lines

Esra Güzel Tanoğlu[1], Şükrü Öztürk[2]

[1] Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye
[2] İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as/Bu makaleye atıf için: Güzel Tanoğlu E, Öztürk Ş. Ewing sarkoma hücre hatlarında miR-214-3p'nin fonksiyonel rolünün değerlendirilmesi. J Med Palliat Care 2020; 1(2): 23-27.

ÖZ

Giriş/Amaç: Ewing sarkoma, nöral orijinli çocukluk çağında kemikte görülen malign kemik tümörüdür. MikroRNA'ların kanser patogenezinde önemli rolleri vardır. Tanımlanan insan mikroRNA'larının yarısına yakınının genomun kırılgan yerlerinde bulunması nedeniyle bu küçük moleküllerin kanser progresyonunda biyobelirteç olarak rol alabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, miR-214-3p'nin hücre hatlarında Ewing sarkoma progresyonu üzerindeki fonksiyonel rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ewing sarkoma hücre hatlarından TC-71, TC-106, CHLA-99 çalışmada kullanıldı ve tümör süpresör mikroRNA olan miR-214-3p'nin fonksiyonel rolü kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincirleme reaksiyonu (qRT-PZR) ile araştırıldı. Fonksiyonel in vitro çalışmaları kapsamında proliferasyon, migrasyon, invazyon ve apoptoz assay çalışmaları gerçekleştirildi.

Bulgular: miR-214-3p'nin TC106 hücre hattında anlamlı düzeyde azalış gösterirken, TC71 ve CHLA99 hücre hatlarında ise anlamlı olarak değişmediği tespit edildi. miR-214-3p'nin, TC106 hücrelerinde yapılan ileri fonksiyonel çalışmalardan proliferasyon, migrasyon, invazyon ve apoptoz assay çalışmalarıyla azalış gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Ewing sarkomada miR-214'ün hücre hatlarındaki olası fonksiyonunu incelediğimiz bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda, literatürde ilk kez miR-214-3p'nin Ewing sarkoma hücre hatlarında düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve tümör süpresör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ewing sarkoma, miR-214-3p, hücre hattı

ABSTRACT

Introduction/Aim: Ewing sarcoma is a malignant bone tumor in childhood, of neural origin. MicroRNAs have important roles in cancer pathogenesis. Since almost half of the identified human microRNAs are located in the fragile parts of the genome, these small molecules are thought to play a biomarker role in cancer progression. In this study, it was aimed to investigate the functional role of miR-214-3p on Ewing sarcoma progression in cell lines.

Material and Method: TC-71, TC-106 and CHLA-99 Ewing sarcoma cell lines were used in the study and the functional role of miR-214-3p, a tumor suppressor miRNA was investigated by quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). Within the scope of functional in vitro studies, proliferation, migration, invasion and apoptosis assay studies were carried out.

Finding: It was found that miR-214-3p decreased significantly in the TC106 cell line, but not significantly changed in the TC71 and CHLA99 cell lines. It has been determined that miR-214-3p decreased from advanced functional studies in TC106 cells with proliferation, migration, invasion and apoptosis assay studies.

Conclusion: In line with the results of this study, in which we examined the possible function of mir-214 in cell lines in Ewing sarcoma, for the first time in the literature, it was found that miR-214-3p had a low expression level in Ewing sarcoma cell lines and had a tumor suppressor effect.

Keywords: Ewing sarcoma, miR-214-3p, cell line

Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Esra Güzel Tanoğlu, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye
E-mail / E-posta: esra.guzel@sbu.edu.tr
Received / Geliş: 10.05.2020 **Accepted / Kabul:** 10.06.2020

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

GİRİŞ

Ewing sarkoma (EWS), tüm yaşlarda osteosarkom ve kondrosarkomdan sonra üçüncü sıklıkta görülen çocukluk çağı tümörüdür. Kemik ve yumuşak dokularda rastlanan bu tümör, agresif seyir göstermektedir (1). EWS tedavisinde cerrahi ve kemoradyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Sıklıkla metastaz yapan ve genellikle ölümle sonuçlanan bu kanser tiplerinin tanı ve tedavisine yönelik çalışmalar halihazırda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, EWS tanısı alan bireyler için acilen yeni ve etkili tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (2).

MikroRNA'lar (miRNA); yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda, proteine çevirisi olmayan genler tarafından üretilen, kodlanmayan kısa RNA dizileridir. Gen regülatörü özelliği gösteren ve çeşitli genleri hedefleyen miRNA'ların kanserlerin patogenezindeki rollerinin aydınlatılması önem arz etmektedir (3). miRNA'ların farklı hücre tiplerinde ve farklı gelişim aşamalarında anormal şekilde eksprese edildiği birçok çalışmada gösterilmiştir (4,5). Bu veriler, miRNA'ların hücre büyümesinde farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü gibi önemli roller oynadığını göstermektedir. MiRNA'ların kanser gelişiminde hedef mRNA'nın türüne göre onkogen veya tümör süpresör genler gibi davrandıkları deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (6). Tümörlü dokularda normale göre azalış gösteren miRNA'lar hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, hücre invazyonunu ve apoptozu inhibe ederek düzenler. Birçok miRNA ve hedefleri yakın zamanda tanımlanmış olmasına rağmen, miR-214-3p'nin bazı kanser türlerinde proliferasyon, apoptoz, metastaz ve anjiyogenez gibi hücre döngüsünü düzenleyen genleri hedefleyerek regülasyonlarında rol oynadığı bildirilmiştir (7,8). miR-214-3p'nin dizisi 5'-ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU-3' şeklinde olup bazı kanserler üzerinde tümör süpresör veya onkogenik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (9).

Bu çalışmada, miR-214-3p'nin hücre hatlarında EWS progresyonu üzerindeki fonksiyonel rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre hattı çalışması olduğu için, çalışmamızın yapılması için etik kurul onayına ihtiyaç olmamıştır. Çalışmamız, Dünya Tıp Birliği Helsinki İlkeler Deklarasyonu'nun Etik Standartlarını karşılamaktadır.

Hücre Kültürü

Ewing sarkoma hücre hatlarından TC-71, TC-106 ve CHLA-99, Children's Oncology Group (Texas, US)'tan alındı. EWS hücre hatları %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin, Streptomisin, Ampisilin (PSA) ve L-Glutaminin IMDM besiyerine ilavesiyle 37 °C'de %5 CO2'li ortamda inkübe edildi.

RNA İzolasyonu

Hücrelerin yoğunluğu 5-10x106/ml ulaştığında hücrelerin üzerine 1 mL Trizol solüsyonu ile protokol doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Thermo Scientific, US). İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık kalitelerinin tespiti NanoDrop ND-2000c spektrofotometre cihazında 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile tespit edildi.

MiR-214-3p'nin qRT-PZR ile Doğrulanması

Ewing sarkoma hücre hatlarında miR-214-3p'ün ifade düzeyini tespit etmek için izole edilen RNA'lar, miR-214-3p'ye ve kontrol olarak RNU43'e özgü primer kullanılarak cDNA'ya çevrildi. cDNA'ya çevrilen örnekler hsa-miR-214-3p'ye ve RNU43'e özgü prob (Applied Biosystems Foster City, CA) ve Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) kiti ile LightCycler480-II gerçek zamanlı PZR cihazında üretici firmanın protokolüne göre reaksiyona sokuldu.. Deneyler iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı miRNA'ların kantitatif analizleri delta-delta-CT metoduyla tespit edildi.

EWS Hücrelerinde miR-214-3p ile Transfeksiyonu

TC-106, TC-71 ve CHLA-99 hücre hatlarında miR-214-3p'nin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir geni hedeflemeyen bir oligonükleotid dizisi kontrol miRNA (nontargeting miRNA) olarak kullanıldı. Hücreler, her bir kuyucuk için 3000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plate'e ekildi. X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent kullanılarak miR-214 hücrelere kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde dağıtıldı. 1 saat 37 °C'de inkübe edilen hücreler üzerlerine 500 µl Opti-MEM ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. miRNA'ların transfeksiyon başarısını test etmek için "Taqman Reverse Transcriptase Kit" kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. qRT-PCR ile doğrulama işlemi yapıldı.

Hücre Proliferasyonu

Hücrelerin proliferasyon kapasiteleri MTS Assay yöntemi ile WST-1 kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler oyuk başına 3x103 hücre yoğunluğunda 96 well platelere yerleştirildi ve 24 saat sonra X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-214-3p mimik, ve hedeflemeyen miR ile transfekte edildi. Çoğalma oranları, transfeksiyondan sonra 3 gün boyunca her 24 saatte bir ölçüldü. Hücre çoğalması, mikroplaka okuyucu ile 490 nm'de absorbans ölçüldü ve hücreler thoma lamında sayıldı.

Migrasyon ve İnvazyon Assay

Hücre migrasyon ve invazyon analizleri Corning Transwell plateler (Corning) kullanılarak yapıldı. Migrasyon assay için BioCoat™ Matrigel® ve Invasion

Chambers (Corning, NY, ABD) kullanıldı. MiR-214 mimik hedeflemeyen miR ile transfekte edildikten sonra hücreler, iki kopya halinde kuyucuk başına 5x105 hücre yoğunluğunda invazyon platelerine ekildi. 24 saat sonra, migrasyona uğrayan hücreler %100 metanol ile sabitlendi ve %2 etanol içerisinde %0,3 kristal viyole ile boyandı. Ardından hücreler sayılarak hücrelerin migrasyon ve invazyon kapasiteleri hesaplandı.

Apoptoz Assay

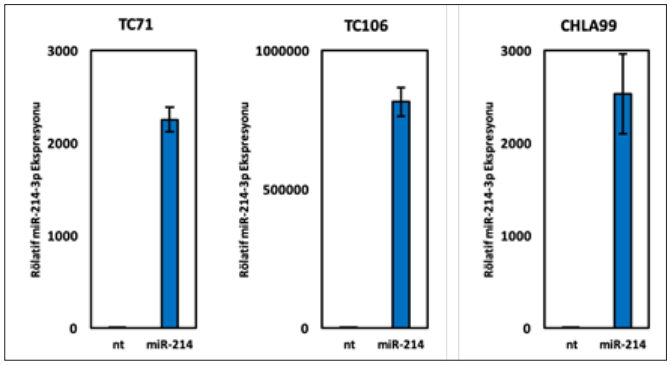
MiR-214-3p'nin TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerindeki apoptotik seviye değişimlerinin tespiti için apoptoz assay gerçekleştirildi. MiR-214-3p ile transfekte edilen hücreler kaspaz-3 aktivitesi ile "CaspACETM Assay System, Colorimetric (Promega)" kiti kullanılarak kaspaz assayi üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Hücrelerin abzorbans ölçümü Multiskan FC micro plate reader (Thermo, Rockford USA) ile gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Student's t test ile yapıldı. İstatistiksel olarak 0,05 veya daha düşük bir "p" değeri anlamlı kabul edildi. Her deney iki kez yapılarak ve ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar 2-ΔΔCT yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

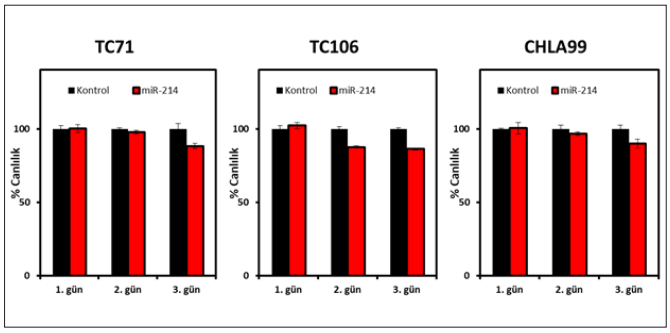
BULGULAR

TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerine miR-214-3p mimik transfeksiyonlarının etkin bir şekilde gerçekleştiği qRT-PZR ile gerçekleştirilen çalışma ile doğrulandı (**Şekil 1**) (TC-71 p=0,001, TC-106 p=0,002, CHLA-99 p=0,01).



Şekil 1. MiR-214-3p ve kontrol miRNA transfeksiyonu sonrası TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerinde mir-214-3p ifade düzeyi

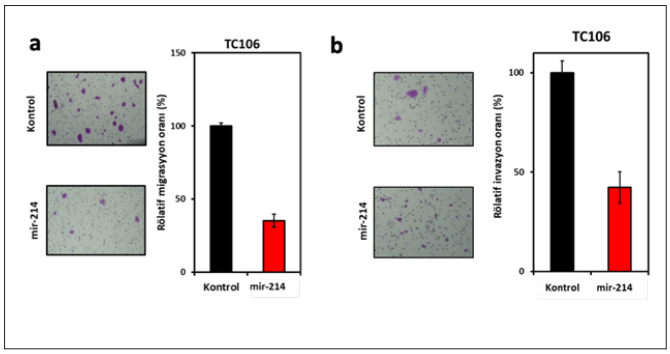
MiR-214-3p transfekte edilen TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerinde MTS assayle yapılan proliferasyon assayleri sonucunda yalnızca miR-214-3p mimiğin transfekte edildiği TC-106 seviyesinin anlamlı değişime uğradığı, TC-71 ve CHLA-99 için bu seviyelerin kontrol miRNA'ya göre anlamlı değişim göstermedikleri tespit edildi (**Şekil 2**) (TC71=0,08, TC106=0,001, CHLA99=0,17).



Şekil 2. TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerinde mir214-3p'nin transfeksiyonu sonrası proliferasyon grafiği

Hücrelerin migrasyon kapasiteleri değerlendirmek için yapılan assay çalışmaları sonrasında TC106 hücrelerine transfekte edilen miR-214-3p ve kontrol miRNA sonrası, miR-214-3p ile muamele edilen TC106 hücrelerinde belirgin azalış olduğu saptanmıştır (**Şekil 3a**) (TC71=0,0001, p>0,05).

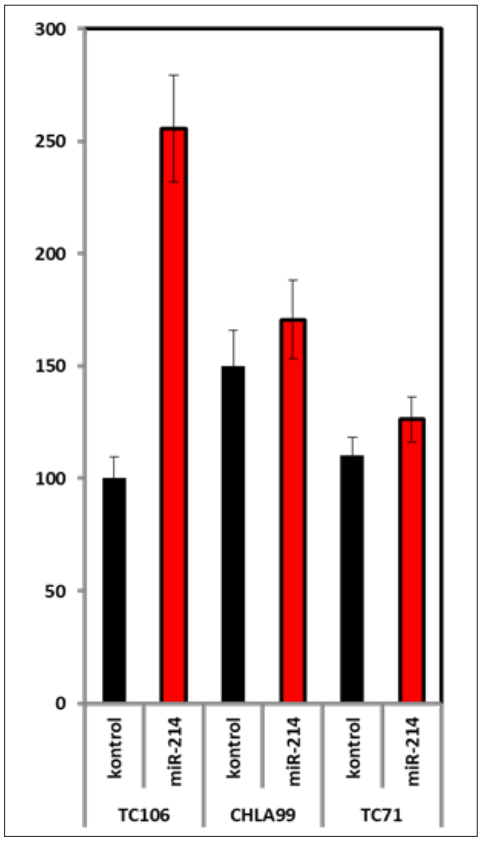
MiR-214-3p transfekte edilen TC106 hücrelerinin invasyon oranlarında da benzer değerler bulunarak invazyon kapasitesinde kontrol miRNA'ya göre azalma olduğu gözlendi (**Şekil 3b**) (TC71=0,007, p >0,05).



Şekil 3. TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerinde mir214-3p'nin transfeksiyonu sonrası a) migrasyon ve b) invazyon oranları

İleri in vitro doğrulama çalışmalarına TC71, TC106, CHLA-99 hücresinde miR-214-3p'nin apoptoz aktivitelerinin değerlendirmesi işlemi ile devam edildi.

Hücrelerde miR-214-3p ve kontrol miRNA ile transfe edildikten sonra hücre proliferasyonun azalmasındaki nedenlerin araştırılması için hücrelerin Kaspaz-3 seviyeleri ölçüldü. Erken apoptotik hücrelerin artmasıyla artış gözlenmesi beklenen Kaspaz 3 aktivitesinde TC71 ve CHLA99'da anlamlı değişim gözlenmezken (p>0,05) TC106 hücresinde miR-214-3p transfeksiyonu sonrası apoptoz indüklenmesinde rol oynadığı tespit edildi (**Şekil 4**) (p=0,007).



Şekil 4. TC-71, TC-106 ve CHLA-99 hücrelerinde mir214-3p'nin transfeksiyonu sonrası apoptoz seviyeleri

TARTIŞMA

Ewing Sarkoma hücre hatları (TC71, TC106 ve CHLA99); agresif özellik göstermektedirler ve bu yönüyle klinik olarak agresif tümör davranış gösteren EWS'i taklit etmektedirler. Bu agresif davranış modeli nedeniyle, EWS tanısında rol alabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi, erken tanı ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önem arz etmektedir (10).

MiR-214-3p'nin kemik oluşumunu inhibe etmek için osteoklastlara transfer edildikten sonra kemik oluşumunda azalma görüldüğü tespit edilmiş ve iskelet bozukluklarının tedavisinde kullanılması için önemli bir aday olarak kullanılması önerilmiştir (11). MiR-214-3p'nin osteoblast fonksiyonu için gereken ana transkripsiyon faktörlerinden biri olan ATF4 tarafından hedeflendiği ve miR-214-3p'nin iskelet oluşumu ile ilişkisi olduğu aynı zamanda osteoblasta özgü transkripsiyon faktörü olan Sp7 hedeflenerek C2C12 miyoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşmasının baskılanmasında rol oynadığı yapılan çalışmalar arasındadır (11). Başka bir çalışmada pankreatik kanserde miR-214 artan ekspresyonunun kemoterapiye artan direnç gösterdiği ve onkogen özellik gösterdiği saptanmıştır (12). Servikal kanserlerde miR-214 seviyesinin azaldığı HeLa kanser hücrelerinde ise MAP2K3 ve MAPK8 genlerini hedefleyerek normal gruplara göre miR-214'ün ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir (13).

Bir diğer çalışmada miR-214-3p'nin, retinoblastomdaki kemorezistansını inhibe etmek için bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü, bu da miR-214-3p'nin retinoblastom tedavisi için potansiyel tanısında ve terapötik ajan olarak kullanılabileceği önerilmiştir (14).

MiR-214'ün proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi hücresel süreçleri düzenleyen genleri hedefleyerek onları aktive ettiği tahmin edilmektedir (15). Yapılan bir diğer çalışmada, anjiyosarkomunun mikro-tanecikler yoluyla miR-214-3p salgıladığı primer tümörlerin cerrahi rezeksiyonu plazma miR-214-3p'nin seviyesini düşürdüğü anjiyosarkomunda bu miRNA'ların malign endotel proliferatif hastalıklar için tanısal biyobelirteçler olarak potansiyel olabileceği önerilmiştir (16).

Bir diğer çocukluk çağı malign yumuşak doku kanseri olan Rabdomiyosarkom hücre hatlarında N-ras ekspresyonunun, miR-214'ün pro-miyojenik ve anti-proliferatif aktivitelerini nötralize ederek miR-214'ün ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı ve tümör süpresör bir rol oynadığı bildirilmiştir (17). Çalışmamız kapsamında Ewing sarkoma hücre hatlarından olan TC71'de miR-214-3p seviyesinin tümör süpresör görevi gördüğü tespit edilerek ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

SONUÇ

Ewing sarkoma da miR-214'ün EWSFLI ilişkisi gösterilmesine rağmen TC71, TC106 ve CHLA99 hücre hatlarındaki etkisi ve hüresel fonksiyonel deneyleri literatürde ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Ewing sarkoma'nın tanı ve tedavisi için aday biyobelirteç olarak kullanılmasında ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ETİK BEYANLAR

Etik Kurul Onayı: Hücre hattı çalışması olduğu için, çalışmamızın yapılması için etik kurul onayına ihtiyaç olmamıştır.

Aydınlatılmış Onam: Hücre hattı çalışması olduğu için aydınlatılmış onam alınmamıştır.

Hakem Değerlendirme Süreci: Harici çift-kör hakem değerlendirmesi.

Çıkar Çatışması Durumu: Yazarlar, bu çalışmada herhangi bir çıkara dayalı ilişki olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Çalışmayı destekleyen kurum İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 21573).

Yazar Katkıları: Yazarların tümü; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldığını ve son sürümünü onayladıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Applebaum MA, Goldsby R, Neuhaus J, DuBois SG. Clinical features and outcomes in patients with secondary Ewing sarcoma. Pediatr Blood Cancer 2013; 60: 611-5.
2. Gore L, DeGregori J, Porter CC. Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success? Lancet Oncol 2013; 14: e70-8.
3. Guzel E, Okyay TM, Yalcinkaya B, Karacaoglu S, Gocmen M, Akcakuyu MH. Tumor suppressor and oncogenic role of long non-coding RNAs in cancer. North Clin Istanb 2020; 7: 81-6.
4. Suer I, Guzel E, Karatas OF, Creighton CJ, Ittmann M, Ozen M. MicroRNAs as prognostic markers in prostate cancer. Prostate 2019; 79: 265-71.
5. Yilmaz SS, Guzel E, Karatas OF, Yilmaz M, Creighton CJ, Ozen M. MiR-221 as a pre-and postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients. Laryngoscope 2015; 125: E377-81.
6. Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. Cell Cycle 2008; 7: 2493-9.
7. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res 2005; 33: 1290-7.
8. Bar-Eli M. Searching for the 'melano-miRs': miR-214 drives melanoma metastasis. EMBO J 2011; 30: 1880-1.
9. Yang Z, Chen S, Luan X, et al. MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells. IUBMB Life 2009; 61: 1075-82.
10. Tanoğlu EG, Öztürk Ş. Ewing sarkoma ile primitif nöroektodermal tümör hücre hatlarında agresiflik paterninin karşılaştırılması. Kocaeli Med J 2020; 1: 24-31.
11. Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. Nat Commun 2016; 7: 10872.
12. Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, He B, Zhang H, Chen YQ. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. J Hematol Oncol 2010; 3: 46.
13. Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, et al. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. Oncotarget 2016; 7: 16396-408.
14. Yang L, Zhang L, Lu L, Wang Y. miR-214-3p Regulates multi-drug resistance and apoptosis in retinoblastoma cells by targeting ABCB1 and XIAP. Onco Targets Ther 2020; 13: 803-11.
15. Liu F, Lou K, Zhao X, et al. miR-214 regulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis by targeting PSMD10. Int J Mol Med 2018; 42: 3027-36.
16. Zhao X, Wang Q, Lin F, et al. RNA sequencing of osteosarcoma gene expression profile revealed that miR-214-3p facilitates osteosarcoma cell proliferation via targeting ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (UQCRC1). Med Sci Monit 2019; 25: 4982-91.
17. Huang HJ, Liu J, Hua H, et al. MiR-214 and N-ras regulatory loop suppresses rhabdomyosarcoma cell growth and xenograft tumorigenesis. Oncotarget 2014; 5: 2161-75.